

一般演題

1. 神経系細胞のトリブチルスズに対する耐容量は分化に伴って変化する

杉田 佳祐, 作田 隆義, 倉知 正
柴崎 貢志, 石崎 泰樹

(群馬大院・医・分子細胞生物学)

【目的】 環境ホルモンの1種として知られるトリブチルスズ (TBT) は、哺乳類の神経機能障害を引き起こすことが示唆されている。哺乳類の神経系では神経幹細胞からニューロンやグリア細胞が発生する。我々はTBTが分化のステージの異なる神経系細胞に及ぼす影響を検討するために、神経幹細胞およびそれをアストロサイトに分化させた細胞を用いてTBT曝露実験を行った。【方法】 神経幹細胞は、生後3日齢のマウス小脳から調製した細胞をEGF (10 ng/mL) を含む培地で培養し、数回の継代を経て、EGFに応答して生存・増殖する細胞として得た。この細胞は多分化能及び自己再生能を示す。今回は、この細胞をFCS存在下に培養することで、アストロサイトへと分化誘導した。これらの細胞を様々な濃度 (0 nM~1000 nM) のTBTに曝露し、24, 48, 72時間後にMTTアッセイにより細胞の生存を評価した。また、分化マーカーの発現に及ぼすTBTの影響を調べるために、TBTに24時間曝露させた細胞の免疫染色を行った。【結果】 EGF応答性の神経幹細胞は、10%FCS存在下で48時間培養することで、成熟アストロサイトのマーカーであるGFAPを強く発現するようになった。神経幹細胞は500 nM以上のTBTに24時間曝露することでほぼすべてが死滅するのに対し、GFAP強陽性の細胞はTBT濃度が1000 nM以上でも細胞の生存が認められた。神経幹細胞数の増加はTBT濃度に依存して変化し、125 nM以上のTBT濃度では曝露24時間以降の細胞数の増加は認められなかった。TBTによるGFAP発現の変化は観察されなかった。【考察】 分化段階の異なる神経系細胞はTBTに対し耐容量が異なることが明らかになった。また、ある濃度以上では細胞数増加の抑制が起こることも示唆された。この耐容量の違いや、細胞増殖への影響についてはBrdU取り込みなどを用いて詳細な解析を進めている。

2. 周産期水酸化PCB曝露が成熟後仔マウスの運動協調機能へ及ぼす影響

蒔島 旭, 下川 哲昭, 高鶴 裕介
天野 出月, レスマナロニー, 鯉淵 典之
(群馬大院・医・応用生理学)

発達期の脳は非常に脆弱であるため、この時期の環境

化学物質の曝露によって、子どもの脳発達に影響を及ぼし、さまざまな異常を引き起こすことが示されてきた。初代培養系を用いたこれまでの研究から、4-hydroxy-2', 3, 3', 4', 5'-pentachlorobiphenyl (水酸化PCB) 曝露が小脳プルキンエ細胞の樹状突起の伸長に影響を及ぼすことが報告されている (Kimura-Kuroda et al., 2007)。しかし水酸化PCBの周産期の曝露によって仔の小脳機能の発達にどのような影響を及ぼすかはあまり分かっていない。本研究では、胎仔期または授乳期に水酸化PCBを曝露したマウスを用いて、ロータロッド試験によって運動協調機能を検証し、水酸化PCB曝露が小脳機能に影響を及ぼすかについて検討した。胎仔期曝露条件では、妊娠したC57BL/6Jマウスに、コーン油に溶解した水酸化PCBを0.05または0.5mg/kg b.w.の濃度で、妊娠10日目から18日目まで1日おきに投与した。授乳期曝露条件では、母獣にOH-PCB 106を0.05または0.5mg/kg b.w.の濃度で、出産後3日目から13日目まで1日おきに投与した。これらの母獣の雌雄仔が成熟後にロータロッド試験を行なった。その結果、授乳期0.05および0.5mg/kg b.w.曝露群の雄仔において、試験の成績が対照群と比べて有意に低下した。このことから、水酸化PCBの曝露は、仔の小脳機能発達に影響を及ぼすことが示された。また水酸化PCBの曝露影響は、曝露時期や性によって異なることが示唆された。

3. 細胞質型チロシンホスファターゼ Shp2 の成熟脳における機能解析

草苺 伸也,¹ 橋本 美穂,² 柴崎 貢志³
吾郷由希夫,⁴ 松田 敏夫,⁴ Benjamin G. Neel⁵
小谷 武徳,⁶ 村田 陽二,⁶ 的崎 尚^{1,6}
大西 浩史²
(1 群馬大・生調研・バイオシグナル分野)
(2 群馬大院・保・生体情報検査科学)
(3 群馬大院・医・分子細胞生物学)
(4 大阪大学大学院
薬学研究科薬物治療学分野)
(5 オンタリオがん研究所)
(6 神戸大学大学院医学研究科
シグナル統合学分野)

細胞質型チロシンホスファターゼ Shp2 は、2つのSH2ドメインとホスファターゼドメインから構成され、組織普遍的に発現する。Shp2はチロシンリン酸化依存的にSH2ドメインを介して基質分子と結合し、活性化される。これまでの研究により、Shp2は細胞増殖因子やサイ

トカインシグナルの下流で Ras/MAPK カスケードをポジティブに制御することで、細胞の増殖や分化制御に関与することが明らかとなっている。このことから、Shp2 の機能破綻は発生・発達過程への影響が予想されるが、実際に、Shp2 の遺伝子破壊 (KO) マウスでは中胚葉の形成不全によって胎生致死となることが報告されており、Shp2 が発生過程における細胞の増殖・分化の制御に必須の機能分子であることが示されている。Shp2 は中枢神経系においてもその発現が認められるが、胎児期の脳では特にその発現が高く、神経幹細胞から神経細胞とグリア細胞への分化の運命決定に重要な役割を果たすことが示されている。一方、Shp2 は分化を終えた神経細胞にも発現し、成熟脳においても高い発現が認められることから、成熟後の神経細胞の機能制御に関与することが考えられるが、成熟脳における Shp2 の機能はまだ十分に検討されていない。この問題を解決するため、我々は、Cre-LoxP システムを用いて成熟前脳神経細胞特異的な Shp2 コンディショナル KO (cKO) マウスを作製し、成熟脳における Shp2 の機能について検討を行った。Shp2 cKO マウスは正常に生まれ、生後 5 週目以降の大脳皮質や海馬など、前脳に局限して Shp2 の発現が顕著に減少することが確認されたが、生育後の脳の構造に異常は認められなかった。成熟脳における Shp2 の機能を検討するため、このマウスを用いて行動テストバッテリーを行った結果、Shp2 cKO マウスは様々な行動異常を示すことが明らかとなった。

4. 神経幹細胞分化に伴う遺伝子座核内配置の転写依存的変動解析

伊藤 謙治, 魚崎 祐一, 野口 東美
荒川 浩一, 滝沢 琢己

(群馬大院・医・小児科学)

発生期の神経幹細胞における中枢神経系を構成する主要細胞種 (ニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイト) への分化能獲得の時期はエピジェネティックなゲノム修飾などにより厳密に制御されている。一方近年、従来のエピジェネティック修飾に加えて遺伝子座の核内での配置も遺伝子発現の制御に重要であることが様々な細胞種を用いた研究により明らかになっている。しかし、神経幹細胞の分化過程において遺伝子座の核内配置が遺伝子発現の制御にどう関与しているのかは全く不明である。そこで本研究では、神経幹細胞がアストロサイトへの分化能を獲得する過程およびその後アストロサイトへ分化する過程において、アストロサイト特異的遺伝子 Gfap の遺伝子座の核内配置がどう変化するか、またその変化が遺伝子の発現制御ならびにアストロサイト分化にどのような影響をもたらすのか、を解析し、神経幹細胞

の分化制御を新規観点から検討することを目的としている。まず、Gfap と会合する遺伝子を網羅的に探索するため、enhanced circular chromosome conformation capture (e4C) 法を行い、それぞれの細胞種で約 1000 の遺伝子が Gfap と会合していることを見出した。胎生後期の神経幹細胞とそこから分化したアストロサイトに対する発現アレイと e4C の結果を統合したところ、いくつかの遺伝子との会合が転写活性と関連して起こることを明らかにした。興味深いことに、そのうちのいくつかの遺伝子が Gfap と同じく、転写因子 STAT3 依存的に発現誘導される遺伝子であった。その結果を DNA fluorescence in situ hybridization (FISH) 法で確認したところ、神経幹細胞由来のアストロサイトにおいて、それらの遺伝子が Gfap と会合する割合が大きく増加していた。以上の結果から、STAT3 依存的な遺伝子座の会合が神経幹細胞のアストロサイト分化に重要である可能性が示唆された。

5. ニューロン成熟過程における LaminB1 発現変動のクロマチン核内配置への影響

野口 東美, 伊藤 謙治, 魚崎 祐一
荒川 浩一, 滝沢 琢己

(群馬大院・医・小児科学)

ニューロンは、誕生後に細胞分裂を経ずにその機能並びに形態を劇的に変化させる。この過程で細胞核の形態も大きく変化するが、これと連動すると考えられるクロマチン空間配置の変化に関する先行研究は少ない。一方、核膜内直下の構造物ラミナの主要構成分子 Lamin は、核の形態維持のみならず、細胞核内のクロマチン配置の区画化並びにエピジェネティック制御に関与していることが知られている。本研究では、ニューロン成熟過程におけるクロマチン空間配置の変化、またこれに対する Lamin の役割について調べることを目的としている。これまでに、マウス海馬ニューロンでのマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、14 番染色体に、成熟依存的に発現上昇する遺伝子数の割合が高い領域を見出した。DNA FISH によりその領域は、成熟に伴い核膜近傍から中心へと移動していることが明らかとなり、LaminB1, B2 mRNA の発現は、成熟に伴い劇的に減少していた。更に、成熟したニューロンでは約 67kDa の完全長の LaminB1 蛋白質が減少し、約 35kDa と分子量の低い蛋白質の出現が認められた。以上のことから、ニューロン成熟に伴う LaminB1 の発現変化による核ラミナの性質変換が、14 番染色体領域の核膜近傍への配置及び遺伝子発現に影響を与えているのではないかと考え、現在、その可能性について検討中である。